

# 虚血性脳傷害におけるミトコンドリア manganese-superoxide dismutase の役割 - 遺伝子 欠損マウスを用いた検討 -

著者	村上 謙介
号	3193
発行年	2000
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/22055">http://hdl.handle.net/10097/22055</a>

氏 名（本籍）                      村                      上                      謙                      介

学 位 の 種 類                      博                      士                      （ 医                      学 ）

学 位 記 番 号                      医                      第                      3 1 9 3                      号

学位授与年月日                      平 成 12 年                      3 月                      1 日

学位授与の条件                      学位規則第 4 条第 2 項該当

最 終 学 歴                      平 成 5 年                      3 月                      31 日  
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目                      虚血性脳傷害におけるミトコンドリア  
manganese-superoxide dismutase の役割  
ー遺伝子欠損マウスを用いた検討ー

（主 査）

論文審査委員                      教授 吉 本 高 志                      教授 北 本 哲 之

教授 糸 山 泰 人

# 論文内容要旨

## 目 的

脳虚血病態において、活性酸素種、ことに superoxide anion ( $O_2^-$ ) が重要な役割を演じているとされている。superoxide dismutase (SOD) は、この  $O_2^-$  を特異的に不均化する抗酸化酵素であり、その局在により 3 分画が存在することが知られている。本研究の目的は、ミトコンドリアに局在する manganese-SOD (Mn-SOD) の脳虚血病態における役割を検討することである。通常のマウスに比較して、Mn-SOD 活性が約 50% 低下した *Sod2* 遺伝子欠損マウス (*Sod2* -/+ ) とその同胞の野生株 (Wt) を用い、中大脳動脈閉塞を負荷して局所脳虚血モデルを作成した。本研究では、脳虚血病態における  $O_2^-$  の産生、ミトコンドリア障害の進行、脳梗塞病変と脳浮腫の形成、神経学的脱落症状、DNA 断裂化の誘導に対する Mn-SOD の役割を検討した。

## 方法及び結果

### 1. 局所脳虚血モデルの作成と脳虚血病態の解剖学的、生理学的背景

Mn-SOD 活性の低下した *Sod2* -/+ とその同胞の Wt を用いて、局所脳虚血後の中枢神経系傷害における Mn-SOD の役割について検討を行った。局所脳虚血は中大脳動脈閉塞を用いて作成した。脳虚血病態の解剖学的バックグラウンドである脳主幹動脈の構築、生理学的バックグラウンドである虚血域の残存脳血流率に、両群間で有意な差異は認められなかった。

### 2. 脳虚血病態における $O_2^-$ の産生

脳虚血病態における  $O_2^-$  の産生を、 $O_2^-$  によってのみ特異的に酸化され、赤色蛍光を発する ethidium (Et) に変化する hydroethidine を用いて検討した。*Sod2* -/+ では、Mn-SOD の活性低下による Et 信号の増強が、とくに虚血辺縁領域において認められた。*Sod2* -/+ では Mn-SOD 活性の低下により、ミトコンドリアを発生源とした  $O_2^-$  が不均化を受けずに過剰産生されていることが示唆された。

### 3. 脳虚血病態におけるミトコンドリア障害

ミトコンドリア膜には内部が陰電位となる膜電位差が存在し、ミトコンドリア機能はこの膜電位差に依存している。本研究では、このミトコンドリア膜電位差によって正常ミトコンドリアに集積される蛍光色素、rhodamine 123 (Rh 123) を用いて、Mn-SOD が脳虚血後のミトコンドリア障害に及ぼす影響について検討した。Wt, *Sod2* -/+ とともに虚血 4 時間後より Rh 123 陽性細胞数の低下が認められ、24 時間後では正常脳と比較して、Rh 123 陽性細胞が有意に減少していた。また、*Sod2* -/+ では Wt に比較して、有意に Rh 123 陽性細胞が減少していた。以上から、

Mn-SOD は脳虚血病態において、ミトコンドリア機能の保護的役割を有することが示唆された。

#### 4. 脳虚血後の組織傷害及び神経脱落症状

Mn-SOD 活性の低下が組織傷害、神経学的症状に及ぼす影響について検討した。脳虚血 24 時間後の梗塞体積、脳浮腫をあらわす虚血側大脳半球拡大率は、Wt に比較して *Sod2*<sup>-/+</sup> で有意に増加していた。また、神経脱落症状、致死率とも *Sod2*<sup>-/+</sup> で Wt に比較して有意に悪化していた。以上から、ミトコンドリアより発生する  $O_2^-$  は、組織傷害の伸展を助長し、神経学的予後を悪化させることが明らかとなった。

#### 5. 脳梗塞巣における DNA 断裂化の誘導

虚血性脳傷害による DNA 断裂化の誘導における Mn-SOD の役割を、TUNEL 染色法を用いて検討した。虚血域における TUNEL 陽性細胞を定量し、*Sod2*<sup>-/+</sup> と Wt との間で比較したが、両群間で有意差は認めなかった。Mn-SOD は、脳虚血後の DNA 断裂化の誘導に影響を及ぼさないと考えられた。

### 考察及び結論

*Sod2*<sup>-/+</sup> では、脳虚血病態においてミトコンドリアを発生源とする  $O_2^-$  の産生が亢進し、ミトコンドリアの障害が進行していた。また、脳虚血後の組織障害および神経学的症状は、*Sod2*<sup>-/+</sup> で有意に悪化していた。しかしながら、脳虚血後に起こる DNA 断裂化を介した細胞死には Mn-SOD は影響を及ぼさないことが明らかとなった。これらの結果は、Mn-SOD が活性酸素である  $O_2^-$  によるミトコンドリア障害を抑制することでエネルギー代謝を維持し、虚血性脳傷害に対し保護作用を有することを示唆すると考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、ミトコンドリアに局在する抗酸化酵素である manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) の脳虚血病態における役割について、Mn-SOD 活性の低下した遺伝子欠損マウスを用いて検討したものである。

本研究では、Mn-SOD 活性の低下した遺伝子欠損マウスと、その同胞の野生株に局所脳虚血を負荷し、その病態を両群間で比較することにより、Mn-SOD の脳虚血病態における役割を検討するという方法を用いている。局所脳虚血後の梗塞病変の形成は、Mn-SOD 活性の低下した遺伝子欠損マウスで拡大していたものの、虚血性脳傷害に深く関与しているとされている apoptotic cell death には差異は認められなかった。

これらの結果は、遺伝子欠損マウスでは apoptotic cell death よりも、おもに necrotic cell death により脳梗塞病変が拡大していることを示唆している。Mn-SOD の、虚血性脳傷害における役割、ことに apoptotic cell death に対する効果についての報告はこれまでなく、新しい知見と考えられる。

また、本研究では虚血性脳傷害におけるパラメーターとして superoxide anion ( $O_2^-$ ) の発生、ミトコンドリア障害の進展についても検討を行っている。これらの検討は、これまでおもに *in vitro* で用いられてきた蛍光色素を応用することで、その時間的空間的な検討を *in vivo* で行った点は新しい手法であり、意義深いと言える。本遺伝子欠損マウスでは Mn-SOD 活性の低下により、おもに虚血辺縁領域で  $O_2^-$  が解毒されずに過剰産生され、それによりミトコンドリア障害が経時的に進行していた点が明確に示されている。これらの結果は、Mn-SOD がミトコンドリアより発生する  $O_2^-$  を解毒することでミトコンドリアを保護し、エネルギー枯渇による necrotic cell death を抑制することで脳保護的役割を演じていることを明らかにしている。

以上、本研究では新しい手法を取り入れながら、脳虚血病態における Mn-SOD の脳保護的役割を明らかにしており、今後の脳虚血病態の解明に大きく寄与するものと考えられる。よって、博士論文に値するものと考えられる。